

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-131180

(43) 公開日 平成8年(1996)5月28日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 17/18		C 7432-4B		
A 6 1 K 31/40				
35/70	A F H	7431-4C		
C 1 2 P 17/10		7432-4B		
// C 0 7 D 209/70		8217-4C		
審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 7 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願平6-278182	(71) 出願人	000006091 明治製菓株式会社 東京都中央区京橋2丁目4番16号
(22) 出願日	平成6年(1994)11月11日	(71) 出願人	000005968 三菱化学株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
		(72) 発明者	坂下 満明 神奈川県横浜市港北区師岡町760番地 明 治製菓株式会社薬品総合研究所内
		(72) 発明者	高木 誠之 神奈川県横浜市港北区師岡町760番地 明 治製菓株式会社薬品総合研究所内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 サイトカラシンの製造法及びそれらを含有する抗コクシジウム剤

(57) 【要約】 (修正有)

【構成】 ラミクロリジウム属に属するカビによる既知
抗生物質、サイトカラシンの製造法の提供。

【構成】 ラミクロリジウム属に属するカビを培養し、
培養物からサイトカラシンを得るサイトカラシンの製造
法及びそれらを含有するコクシジウム原虫の予防治療
剤。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ラミクロリジウム属に属するカビを栄養培地中で培養し、その培養物からサイトカラシンを採取することを特徴とするサイトカラシンの製造法。

【請求項2】 サイトカラシンの少なくとも1種以上を有効成分として含有する抗コキシジウム剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はラミクロリジウム属に属するカビによる既知抗生物質、サイトカラシンの製造法及びその用途に関するものである。さらに詳しくは、ラミクロリジウム属に属するカビを培養し、培養物からサイトカラシンを得ることを特徴とするサイトカラシンの製造法及びそれらを含有するコキシジウム原虫の予防治療剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 抗コキシジウム作用を有する化合物は多数知られており、本物質の如く微生物の生産物で抗コキシジウム活性を有する抗生物質には、モネンシン、サリノマイシン等がある。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 前記のとおり多数の抗コキシジウム剤が知られているが、豚・牛・羊・山羊等

2

の家畜や鶏等の家禽及び犬・猫等のペットにおいて、コキシジウム症は現在も流行しており、かつ経済的に深刻な問題である。すなわち、コキシジウム原虫の感染によって、感染動物は貧血症、栄養不良、虚弱、体重の減少、胃・腸管壁及び他の組織・器官の損傷を引き起こし、飼料効率の低下、生産性低下の原因のひとつとなって経済的損失が大きい。また、コキシジウム原虫は薬剤に対する耐性を発現させ、薬剤の効力を低下させる場合が多い。したがって、新規な抗コキシジウム剤を提供することは常に求められている課題である。

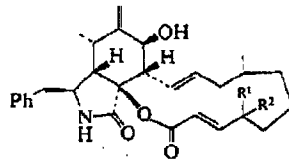
【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明はこれらの課題を解決するために、サイトカラシンの製造法及びそれらを含有する抗コキシジウム剤を提供するものである。サイトカラシンは、D.C.Aldridge等(J.Chem.Soc.,Chem.Commun.,1967,1667;1969,923;1973,551)によって、ヘルミントスポリウム・デマテイオイデウム(Helminthosporium dematioideum)、ザイゴスポリウム(Zygosporium)属等のカビの培養液から得られた物質であり、それらの主な物質は下記の化学構造式で示される。

【0005】

【化1】

3



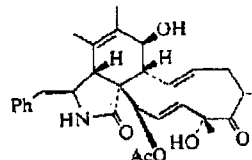
Cytochalasin A

 $R^1 R^2 = O$

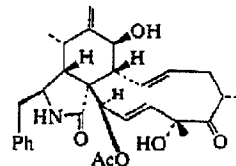
Cytochalasin B

 $R^1 = H, R^2 = OH$

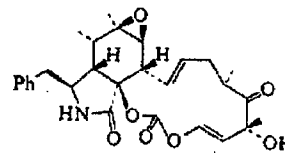
4



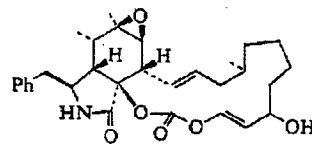
Cytochalasin C



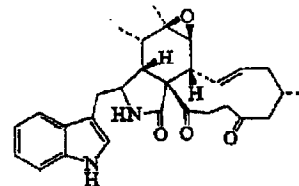
Cytochalasin D



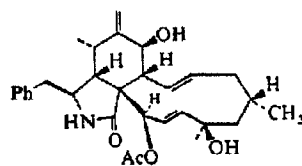
Cytochalasin E



Cytochalasin F



Cytochalasin G



Cytochalasin H

【0006】本物質はボトリテイス (*Botrytis*) 属、ペニシリウム (*Penicillium*) 属等に対する抗菌作用、ポリオウイルスに対する抗ウイルス作用、抗腫瘍作用及び抗炎症作用等を有することが知られている。

【0007】本発明者らは抗コクシジウム活性物質のスクリーニングを行い、ラミクロリジウム属の培養液に強い活性物質の存在を確認し、本物質を単離し、サイトカラシンであることを明らかにした。さらに、種々のサイトカラシンについて試験したところこれらが抗コクシジウム活性を有することを発見し、本発明を完成させた。

【0008】前述したサイトカラシンは、公知の方法、即ちヘルミントスポリウム・デマテイオイデウム (*Helminthosporium dematioidium*) 属、ザイゴスポリウム (*Zygosporium*) 属に属するカビ等の培養液から得ることも可能であるが、本発明者らはラミクロリジウム (*Ramichloridium*) 属に属するカビの培養液中にもサイトカラシンが産生されることを見出した。かかるカビとしては、ラミクロリジウム (*Ramichloridium*) 属に属し、その培養液中にサイトカラシンを産生する能力を有するもので

あれば特に制限はされないが、具体的には本発明者らが分離したラミクロリジウム・シュルツェリー・バル・シュルツェリー (*Ramichloridium Schulzeri* var. *schulzeri*) D 2 9 5 1 株 (以下、「本菌株」と略す) が挙げられる。本菌株は工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-14620として寄託されているが、本菌株の微生物学的性状は以下の通りである。

【0009】(1) 形態学的性状

コロニーの生育は三浦培地 (LCA) 上、27℃、3週間の培養で中程度、コロニーの形状は、幾分気生菌糸が発達し、綿毛状となる、はじめ無色、のちに黄褐色を呈する。基底菌糸は分枝し、多数の隔壁を有する、巾6.3 μmに至る、無色～淡色を呈する。厚膜胞子は形成されない。気生菌糸の発達は中程度、菌糸は分枝し多数の隔壁を有する、巾4.4 μmに至る。分生子柄は基底菌糸あるいは気生菌糸より単生的に生じる、通常分枝しない、直立または上方部で時々湾曲する、長さ、47～203 μm、巾2.8～4.1 μm、多数の小歯状突起を形成、シンポジアルに長く伸びる、分生子柄下方部は褐

色、先端部は無色～淡褐色、隔壁を有する。分生子はシンポジオ型分生子形成様式を示す、小菌上に単生、大きさ $6.6\sim9.4\times2.8\sim3.8\mu\text{m}$ 、倒卵形～しずく形、基部は截断状、無色、平滑。

【0010】(2) 各種培地上における培養上の性状
① ポテト・デキストロース寒天培地(PDA)上、27℃、3週間の培養、コロニーの生育は旺盛、コロニー形状はビロード状、はじめ茶灰色、のちに暗い黄茶色を呈する。厚膜胞子は形成されず。気生菌糸は豊富に形成される、巾 $4.7\mu\text{m}$ に達する、淡褐色を呈する。PDA上、3週間の培養で、分生子の形成は観察されなかった。

② 麦芽寒天培地(MA)上、27℃、3週間の培養、コロニーの生育は中程度、コロニー形状はビロード状、はじめ茶灰色のちに黄茶色を呈する。基底菌糸は分枝し、多数の隔壁を有する、巾 $5.3\mu\text{m}$ に至る、淡褐色を呈する、時々菌糸内に赤褐色の色素を含有する。MA上、3週間の培養で分生子の形成は観察されなかった。

【0011】(3) 生理学的性状
生育温度(PDA上、7日間培養)；15～30℃
至適温度；20～27℃(37℃での生育は認められず)

生育pH(三浦培地、7日間培養)；3～8
至適pH；4～6

【0012】(4) 分類学的考察

本菌株(D2951)は、①シンポジオ型分生子形成様式を示す②分生子柄は無分枝、多数の小菌状突起を形成子、シンポジアルに長く伸びる、分生子離脱後、多数の分生子分離痕を生ずる③分生子は1細胞、という特徴を有することから不完全菌亜門―不完全糸状菌綱のシンポジオ型分生子形成群のラミクロリジウム属(*Ramichloridium*)に帰属する。同属は近縁属であるリノクラデア属(*Rhinocladiella*)から主に分生子柄形成構造の特徴によって区別されている。*Rhinocladiella*属は分生子柄形成構造が分枝し、先端部で複雑に分化する特徴を有する。さらに出芽型細胞あるいはExophialaステージの多形性のアナモルフが共存する特徴を有する。G.S.De Hoog(1977)の*Rhinocladiella and allied genera*, (Studies in Mycology No.15; 1～140 ページ)によれば、*Ramichloridium*属には、13種3変種が知られている。これらの分類群は主として分生子柄、分生子の形態学的特徴によって区別されている。G.S.De Hoog(1977)の*Ramichloridium*属の種の検索表(60～61ページ)に従って、本菌株(D2951)の種のレベルの検索を行ったところ、ラミクロリジウム・シュルツェリー・バル・シュルツェリー(*Ramichloridium schulzeri* var. *schulzeri*)の特徴と合致した。*R. schulzeri*の変種として、他にvar. *tritic*とvar. *flexuosum*が知られているが、本生産菌は分生子形態の特徴から、これら二変種から明確に区別できた。よって本生産菌は、*Ramichloridium schulzeri* var. *schulzeri*(D2951)と同定した。

zeri var. *schulzeri* (D2951)と同定した。

【0013】次に、本発明におけるサイトカラシン製造法につき説明する。例えばラミクロリジウム(*Ramichloridium*)属に属するサイトカラシン生産菌を、通常の微生物が利用しうる栄養物を含有する培地で培養する。栄養源としては、従来菌類の培養に利用されている公知のものが使用できる。例えば、栄養源としては、米、グルコース、水飴、デキストリン、澱粉、糖蜜、動・植物油等を使用しうる。また、窒素源としては、大豆粉、小麦胚芽、コーンステーパーリカー、綿実粕、肉エキス、ペプトン、酵母エキス、硫酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、尿素等を使用しうる。その他必要に応じ、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、塩素、リン酸、硫酸及びその他のイオンを生成することのできる無機塩類を添加することもある。また、菌の生育を助け、サイトカラシンの生産を促進するような有機物及び無機物を適宜添加することもできる。

【0014】培養法としては、好気的条件下での培養法、特に固体培養法や深部培養法が適している。培養に適切な温度は、15～35℃であるが、より好ましくは20～30℃付近で培養する。サイトカラシンの生産は培地や培養条件により異なるが、固体培養、振とう培養、タンク培養のいずれにおいても通常2～14日間でその蓄積が最高に達する。培養中のサイトカラシンの蓄積量が最高になった時に培養を停止し、培養液から目的物質を単離精製する。

【0015】本発明方法によって得られるサイトカラシンは、サイトカラシン生産菌の培養物から、その性状を利用した通常の方法、例えば、溶剤抽出法、吸着又は分配カラムクロマト法、ゲル濾過法、透析法、沈殿法等を単独で又は適宜組み合わせで抽出精製することができる。例えば、サイトカラシンは、培養菌体中からは、アセトン-水、メタノール-水等で抽出される。この抽出液に含まれるアセトン、あるいはメタノールを留去した水層を、酢酸エチルで抽出し、濃縮物をシリカゲルクロマトグラフィーにて展開することにより、サイトカラシンは精製できる。

【0016】サイトカラシンを抗コクシジウム剤として適用しようとする動物は豚・牛・山羊・羊・鶏・アヒル・七面鳥・ウズラ・犬・猫等の家畜、家禽、ペット等を挙げることができる。また、これらの動物のコクシジウム原虫としては、豚・牛・山羊・羊・鶏を始めとする家禽類の*Eimeria*属、豚・犬・猫の*Isospora*属、猫の*Toxoplasma*属、その他、種々のコクシジウム原虫が知られている。

【0017】サイトカラシンはコクシジウム症の治療及び予防に用いることができる。治療のための投与方法は、経口的または非経口的な方法がある。経口的に投与する場合は、液状の製剤を胃カテーテル等の器具を用いて強制的に投与する方法、通常の飼料または飲料水に混

合して投与する方法、あるいは、通常の経口投与に適した剤型、例えば錠剤、カプセル剤、ペレット剤、巨丸剤、粉剤あるいは軟カプセル剤等で投与する方法がある。非経口的に投与する場合は、ピーナツ油、大豆油等の非水溶性処方、グリセロール、ポリエチレングリコール等の水溶性処方を注射などにより皮下、筋肉内、静脈内、腹腔内等に投与する。また、予防のための投与方法は通常用いられている飼料に混合し経口的に投与するのが一般的な方法である。投与方法としては散剤、粒剤、懸濁剤等の形で使用できる。希釈剤としては飼料または飼料の一部になり得るものが望ましく、例えば大麦粉、小麦粉、裸麦粉、トウモロコシ粉、大豆粉、大豆油かす、菜種油かす、モミガラ、米ぬか、米ぬか油かす、カンショ粉、豆腐かす、各種澱粉、繊維素、乳糖、しょ糖、ブドウ糖、果糖、酵母、腐酵母、菌体残渣、魚粉及び発酵残留物が好ましい。また、一般に知られている飼料添加物、例えば各種ビタミン類、ミネラル類、防腐剤、酵素製剤、蛋白質、炭水化物、アミノ酸類、解熱剤、鎮痛剤及び殺菌剤等と配合併用してもよい。投与期間は予防の場合特に制限はないが、通常肉用鶏では約2カ月、豚では5カ月で充分であることが多い。サイトカラシンの投与量は対象動物及びコクシジウム原虫の種類あるいは投与方法により異なる。例えば、鶏のコクシジウム症を予防するためにサイトカラシンAを飼料に混合して経口的に投与する場合は飼料中80ppm以上を連続的に投与するのが望ましい。

【0018】

【実施例】以下に本発明の実施例を示すが、サイトカラシンの性状に基づきその製造法を種々考案することができる。従って本発明は実施例に限定されるものではなく、実施例の修飾手段は勿論、サイトカラシンの性状に基づいて公知の手段を施してサイトカラシンを生産、濃縮、抽出、精製する方法をすべて包括する。

【0019】実施例1

水飴 2.0%、大豆粉 1.0%、大豆油 0.15%、サングレイン 0.15%、綿実粕 0.5%、FeSO₄・7H₂O 0.0005%、NiCl₂・6H₂O 0.0005%、CoCl₂・6H₂O 0.0005%及び CaCO₃ 0.1%を含有する培地(pH6.0)を40mlずつ20ml三角フラスコ20本に分注し、121℃で20分間オートクレーブ滅菌した。これに本菌株を1白金耳ずつ植菌し、27℃で2日間、210回転にて振とう培養

した。別に米60gと水道水20mlを500ml三角フラスコ100本に分注し、121℃で20分間、オートクレーブ滅菌した。この主発酵培地に前記種培養液を4mlずつ接種し、27℃において14日間静置培養した。

【0020】実施例2

培養終了後、得られた菌体を含む固形物に、50%アセトン水9リットルを加え、1時間攪拌後菌体を濾過して抽出液を得た。菌体抽出液は減圧下でアセトンを留去して(200ml)の濃縮液を得た。この濃縮液のpHを9に調整してから酢酸エチル(400ml)で2回抽出を行い酢酸エチル層を回収し、さらに脱水し、酢酸エチル層を濃縮すると油状物質(2.93g)が得られた。この油状物質をシリカゲルカラム(ワコーゲルC-300)200mlの上部にのせ、ヘキサン500ml及びクロロホルム1000mlさらにクロロホルム-メタノールの混合溶媒(100:1)1000mlで展開するクロマトグラフィーを行い、15mlずつ分画した。このうち、フラクションNo.13~No.40から活性画分Aとして(189mg)と活性画分BとしてフラクションNo.49~No.68(1.792g)を得た。さらに活性画分A189mgをアセトン0.5mlに溶解後少量のヘキサンを加えて室温において静置したところ、82mgの無色針状結晶が得られた。一方、活性画分B1.792gをアセトン5mlに溶解後1mlのヘキサンを徐々に加えて室温において静置したところ、877mgの無色針状結晶が得られた。活性画分A及びBから得られた結晶は各種機器データからそれぞれサイトカラシンA及びBに一致した。

【0021】実施例3

in vitro試験における、鶏コクシジウム原虫、アイメリア・テネラ(Eimeriatenella)に対するサイトカラシンの抗コクシジウム効果を観察した実施例を示す。サイトカラシンA・B・C・D・E・H及びJの7種類のサイトカラシンをそれぞれメタノールで溶解し希釈した溶液にアイメリア・テネラのオーシストを直接曝露し、オーシスト内のスポロシスト、さらにはスポロシスト内のスポロゾイトを阻害するかどうかを顕微鏡下で観察した。サイトカラシンを加えないでメタノールを希釈したものを無投与対照とした。その結果を表1に示した。

【0022】

表1 in vitroにおけるサイトカラシンの抗コクシジウム効果

添加濃度(ppm)	42	21	10.4	8.3	5.2	2.6	1.3
サイトカラシンA	+	+	+	+	+	+	-
サイトカラシンB	+	+	+	+	-	-	-
サイトカラシンC	+	-	-	-	-	-	-
サイトカラシンD	+	+	+	+	+	+	-
サイトカラシンE	+	+	+	-	-	-	-
サイトカラシンH	+	+	+	+	+	+	+

9							10
サイトカラシン J	+	+	-	-	-	-	-
無投与対照	-	-	-	-	-	-	-

+：抗コクシジウム活性あり

-：抗コクシジウム活性なし

【0023】すなわち、無投与対照は全く抗コクシジウム活性を示さなかったのに対し、7種のサイトカラシン A・B・C・D・E・H及びJの最少有効濃度はそれぞれ2.6, 8.3, 42, 2.6, 10.4, 1.3及び21 ppmであった。一方、対照薬として用いたサリノマイシンの最少有効濃度は125 ppmであった。すなわち、サイトカラシンの投与によりin vitroにおいて強い抗コクシジウム活性が得られた。

【0024】実施例4

サイトカラシンを混合した飼料を鶏に経口投与して鶏コクシジウム症の予防効果を観察した実施例を示す。試験群は1群につき2羽を用い、サイトカラシンAの飼料添加濃度80 ppm群及び240 ppm群、サイトカラシンBの400 ppm群、500 ppm群及び600 ppm群の5群をサイトカラシ*

*ン投与群とした。サイトカラシンは、賦形剤として米ぬか油かすを用いて10%製剤を調製し、それぞれの添加濃度となるように均一に混合した。対照薬群はサリノマイシンの50 ppm群及び75 ppm群とし、対照群は未感染無投与群と感染無投与群とした。感染1日前より給餌を開始し、未感染無投与群を除く全群にアイメリア・テネラの成熟オーシストを各羽約50,000個を経口感染させた。試験期間中は不断給餌とし、感染後7日目に解剖してコクシジウム症による盲腸病変値を判定し、2羽の平均値を算出した。また、試験開始時と終了時の群毎の体重を測定し、未感染無投与群(100%)に対する相対増体率を算出し、その結果を表2に示した。

【0025】

表2 サイトカラシン投与による鶏コクシジウム症の予防効果

試験群	盲腸病変値 (平均)	相対増体率 (%)
未感染無投与群	0	100
感染無投与群	+4	58
サリノマイシン 50ppm群	+2	85
サリノマイシン 75ppm群	0	92
サイトカラシン A 80ppm群	0	91
サイトカラシン A 240ppm群	0	68
サイトカラシン B 400ppm群	+2	74
サイトカラシン B 500ppm群	0	55
サイトカラシン B 600ppm群	0	30

盲腸病変値 0：病変なし

+1～+4：軽度～重度

【0026】すなわち、盲腸病変値は投与した薬物の抗コクシジウム効果をそのまま表現する指数とみなされているので、まずその盲腸病変値を見ると、未感染無投与群は病変はなく、感染無投与群は最も重度の+4であった。次に対照薬のサリノマイシンは50 ppmで+2、75 ppmで病変なしであった。これに対し、サイトカラシンAは80 ppm及び240 ppmで病変なし、サイトカラシンBは400 ppmで+2、500 ppm及び600 ppmで病変なしであった。すなわち、サイトカラシンAは80 ppm以上、サイトカラシンBは400 ppm以上でサリノマイシンの実用濃度50 ppmと同等もしくはそれ以上の予防効果を得られた。

【0027】次に、体重変化を見ると、相対増体率はサリノマイシンは50 ppm及び75 ppmでそれぞれ85%と92%

であった。これに対し、サイトカラシンAは80 ppm及び240ppmでそれぞれ91%と68%、サイトカラシンBは400 ppm、500 ppm及び600 ppmでそれぞれ74%、55%及び30%であった。サイトカラシンは濃度が高くなると増体率が低くなる傾向にあったが、サイトカラシンAは充分な予防効果を示す80 ppmではサリノマイシンの増体率と比べ著差はなかった。したがって、サイトカラシンAは80 ppm以上、サイトカラシンBは400 ppm以上で鶏コクシジウム症に対し、明らかな予防効果が認められた。

【0028】

【発明の効果】本発明によりサイトカラシンを工業的に有利に製造することができ、得られたサイトカラシンは抗コクシジウム剤としての有用性が期待される。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 D 491/08		7019-4C		
(C 1 2 P 17/18				
C 1 2 R 1:645)				
(C 1 2 P 17/10				
C 1 2 R 1:645)				
(72) 発明者 播磨谷 健蔵			(72) 発明者 千葉 紀子	
神奈川県横浜市港北区師岡町760番地 明			神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地	
治製菓株式会社薬品総合研究所内			三菱化学株式会社横浜総合研究所内	
(72) 発明者 岡田 忠昭			(72) 発明者 神田 三奈	
神奈川県横浜市港北区師岡町760番地 明			神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地	
治製菓株式会社薬品総合研究所内			三菱化学株式会社横浜総合研究所内	
			(72) 発明者 三川 隆	
			神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地	
			三菱化学株式会社横浜総合研究所内	

PARTIAL TRANSLATION OF JPP No. 8-131180

Title of the Invention: Process for Producing Cytochalasin
and Anticoccidial Agent Comprising
Cytochalasin
Publication Date: May 28, 1996
Application No. 6-278182
Filing Date: November 11, 1994

[0022]

Example 2

After the culture process was completed, nine liters of 50 % acetone aqueous solution were added to a solid comprising the obtained fungus body, the mixture was agitated for one hour, and then the fungus body was removed by filtration to obtain an extract. The fungus extract was subjected to distillation under reduced pressure to remove acetone to obtain a concentrated solution (200 ml). The pH of the concentrated solution was adjusted to 9, and the concentrated solution was extracted with ethyl acetate (400 ml) twice to recover the ethyl acetate layer. The ethyl acetate layer was further subjected to dehydration, and was concentrated to obtain an oil substance (2.93 g). This oil substance was applied to the column with 200 ml of silica gel (Wako gel C-300), and column chromatography eluted with 500 ml of hexane, 1000 ml of chloroform and 1000 ml of a chloroform-hexane mixture solvent (100:1) was performed with fractionation process to obtain each fraction of 15 ml. Among all the fractions obtained, fractions No. 13 to No. 40 were obtained as active fraction A (189 mg) and fractions No. 49 to No. 68 were obtained as active fraction

B (1.792 g). 189 mg of the active fraction A was dissolved in 0.5 ml of acetone, a small amount of hexane was added thereto, and then the mixture was stood at room temperature to obtain 82 mg of colorless needle crystal. On the other hand, 1.792 g of the active fraction B was dissolved in 5 ml of acetone, 1 ml of hexane was gradually added thereto, and then the mixture was stood at room temperature to obtain 877 mg of colorless needle crystal. The crystals obtained from the active fractions A and B were identified to be cytochalasin A and B, respectively, from the data obtained using various analytical devices.